

⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑯ Gebrauchsmuster
⑯ DE 298 09 591 U 1

⑮ Int. Cl. 6:
G 01 N 21/35
G 01 N 33/68
G 01 N 1/28
G 01 N 35/08
G 01 N 35/02
C 12 Q 1/68
// G01N 33/15,33/48

⑯ Aktenzeichen: 298 09 591.2
⑯ Anmeldetag: 28. 5. 98
⑯ Eintragungstag: 24. 9. 98
⑯ Bekanntmachung im Patentblatt: 5. 11. 98

⑯ Innere Priorität:
197 38 566. 4 04. 09. 97

⑯ Inhaber:
Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 76133
Karlsruhe, DE; BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

⑯ Vorrichtung zur Identifizierung von Wirkstoffen

DE 298 09 591 U 1

22.05.98

Forschungszentrum
Karlsruhe GmbH

Karlsruhe, den 27. Mai 1998
PLA 9842 Rü/he

BASF AG

Ludwigshafen, den 27. Mai 1998

Vorrichtung zur Identifizierung von Wirkstoffen

Vorrichtung zur Identifizierung von Wirkstoffen

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Identifizierung von Wirkstoffen gemäß dem ersten Schutzanspruch.

M. J. Swamy, T. Heimburg und D. Marsh in „Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Studies on Avidin Secondary Structure and Complexation with Biotin and Biotin-Lipid Assemblies“, Biophysical Journal Vol. 71 (1996) 840-847 beschreiben Arbeiten zur Aufklärung der Struktur von Komplexen des Proteins Avidin mit Biotin und Biotin-Lipid durch Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FTIR). Hierzu wurden zuerst FTIR-Spektren des Avidin in schwerem Wasser (D_2O) aufgenommen. Anschließend wurde Avidin mit Biotin oder Biotin-Lipid mit gepuffertem D_2O als Lösungsmittel vermischt und mehrere Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt, wodurch offensichtlich eine möglichst hohe Ausbeute des entstehenden Avidin-Komplexes erzielt werden sollte. Von dem Komplex wurden wiederum FTIR-Spektren aufgenommen. Aus den Spektren des Avidins und den Spektren des Avidin-Komplexes wurden Differenzspektren gebildet. Da sich diese Arbeit nur mit der Struktur der Avidin-Komplexe befaßt, werden keine zeitabhängigen Spektren aufgenommen. Die beschriebenen FTIR-Spektren spiegeln in allen Fällen Gleichgewichtszustände wieder. Es werden nicht die Schwingungsspektren von gebundenem normalem Wasserstoff, sondern die - infolge der höheren Masse verschobenen - Schwingungsspektren von gebundenem Deuterium aufgenommen. Infolgedessen kann eine vergleichsweise dicke Küvette (50 μm) eingesetzt werden. Die Frage, ob eine chemische Verbindung, z. B. ein Protein, an einer Koordinationsstelle mit einem bestimmten Liganden einen Komplex zu bilden vermag, spielt in dieser Arbeit keine Rolle, da die Tatsache der Komplexbildung von Avidin mit Biotin bereits bekannt war.

FTIR-Untersuchungen zur Strukturbestimmung von Protein-Komplexen werden außerdem bei M. Gonzales et al: „Interaction of Biotin with Streptavidin“, The Journal of Biological Chemistry Vol. 272, No. 17 (1997) 11288-11294 beschrieben. Die Spektren wurden

sowohl mit einem H₂O- als auch mit einem D₂O-Puffer aufgenommen, wobei die Schichtdicke im Falle von H₂O 6 µm und im Falle von D₂O 50 µm betrug. Ziel der Arbeit ist die Bestimmung der thermischen Stabilität von Biotin und des Biotin-Streptavidin-Komplexes. Die thermische Denaturierung wird in zeitlich aufeinanderfolgenden Spektren dargestellt. Die Bildung der Komplexe wird dagegen spektrometrisch nicht verfolgt.

In D. Moss, E. Nabedryk, J. Breton und W. Mäntele: „Redox-linked conformational changes in proteins detected by a combination of infrared spectroscopy and protein electrochemistry - Evaluation of the technique with cytochrome c“ Eur. J. Biochem. 187, 565-572 (1990) wird über eine elektrochemische Reduktion und eine anschließende erneute Oxidation des Proteins Cytochrom c berichtet. Cytochrom c wird in einer Schichtdicke von 10 bis 15 µm vorgelegt, um die IR-Absorption von Wasser im mittleren Infrarotbereich auszuschließen. Die Reduktion und anschließende erneute Oxidation wurden mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie nachgewiesen. Differenzspektren des reduzierten und erneut oxidierten Zustandes sind dargestellt. Da die Kuvette nur Cytochrom c enthielt, konnte über die Bildung von Proteinkomplexen keine Aussage gemacht werden.

Die Veröffentlichung von A. J. White, K. Drabble und C. W. Wharton: „A stopped-flow apparatus for infrared spectroscopy of aqueous solutions“, Biochem. J. (1995) 306, 843-849 beschreibt eine Apparatur zur Durchführung des sogenannten „stopped-flow“-Verfahrens, in der die Reagentien mit Spritzen in eine Kuvette gespritzt und vermischt werden. HPLC-Ventile haben sich nach Aussage der Autoren wegen des erforderlichen hohen Drucks und der hohen Viskosität von Peptiden nicht bewährt. Mit dieser Apparatur wurden FTIR-Spektren im zeitlichen Bereich von 6,25 Sekunden bis 966 Sekunden nach der Vermischung von ¹²C=O- und ¹³C=O-Cinnamoyl-Chymotrypsin mit einem Deacylierungsmittel in einem D₂O-Puffer aufgenommen, wobei die optische Schichtdicke 50 µm beträgt. Aus den Spektren von ¹²C=O- und ¹³C=O-Cinnamoyl-Chymotrypsin werden Differenzspektren gebildet. In den Conclusions“

20.05.98

findet sich die Feststellung, daß der Aufbau einer „stopped-flow“-IR-Transmissionsküvette, die die Verwendung von (nicht deuteriertem) Wasser zuläßt, nicht möglich ist, weil die starke Absorption von Wasser bei 1640 cm^{-1} eine Schichtdicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ verlangt (in der Arbeit werden fälschlich 5 mm angegeben).

Eine eingehende Beschreibung des „stopped-flow“-Verfahrens findet sich bei Q. H. Gibson und L. Milnes: „Apparatus for Rapid and Sensitive Spectrophotometry“, Biochem. J. (1964) 91, 161-171.

Ein genereller Nachteil der „stopped-flow“-Methoden ist im hohen Totvolumen der Apparaturen infolge der Verwendung von Spritzen zu sehen. Massenscreening-Verfahren können deshalb mit solchen Apparaturen nicht durchgeführt werden, insbesondere weil die Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen von je $400\text{ }\mu\text{l}$ die Standardvorlage für automatisierte Verfahren ist; siehe hierzu J. R. Broach und J. Thorner: „High-throughput screening for drug discovery“, Nature Vol. 384 Supp. 7. November 1996, die einen Überblick über Massenscreening-Verfahren vermitteln. Broach und Thorner zitieren im Hinblick auf die Feststellung der Bindungsfähigkeit eines Liganden am Rezeptor eines Peptids ein Verfahren, wobei Eu^{2+} am Ligand und Allophycocyanin am Rezeptor kovalent gebunden werden. Durch die Bildung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes kommt Eu^{2+} sehr nahe an Allophycocyanin heran, wodurch sich ein als Fluoreszenzsignal nachweisbarer Energietransfer ergibt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zur Identifizierung von Wirkstoffen zu entwickeln, die den Nachweis der Bildung von Komplexen zwischen Reaktanden in einem möglichst geringen Volumen kostengünstig, flexibel und schnell mit reproduzierbaren Ergebnissen ermöglicht. Darüberhinaus soll sich die Vorrichtung für eine Automatisierung eignen.

Die Aufgabe wird durch die im ersten Schutzanspruch beschriebene gelöst.

Erfindungsgemäß werden die Wirkstoffe identifiziert, indem die Bindungsfähigkeit eines Reaktanden, beispielsweise eines Liganden, an mindestens einem weiteren Reaktanden, beispielsweise einem Protein, geprüft wird. Aus den Reaktanden wird eine Mischung hergestellt, von der zu mindestens zwei verschiedenen Zeitpunkten ein IR- oder FTIR-Spektrum aufgenommen wird. Die Messung der Liganden kann in wässriger Lösung erfolgen, wobei die herkömmliche Verwendung von deuterierten Lösungen, beispielsweise deuteriertes Wasser oder deuterierter Puffer, nicht zwingend erforderlich ist. Je nach der Viskosität und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Reaktanden ist gegebenenfalls der Einsatz eines anderen oder weiteren Lösungsmittels angezeigt; auf den Einsatz deuterierter Puffer oder deuterierter Lösungsmittel kann verzichtet werden.

Die Mischung kann entsprechend dem zitierten Stand der Technik hergestellt werden. Bevorzugt wird jedoch die Verwendung von Hochdruckpumpen (bis ca. 400 bar) und der aus der HPLC-Technik bekannten Probenschleifenventile.

Die Mischung soll vorzugsweise in einer Schichtdicke von 1 bis 25 µm, besonders bevorzugt von 8 bis 15 µm, vorgelegt werden. Zweckmäßigerweise wird die Mischung auf dem Weg zu einer und/oder in einer IR-Küvette mit einer entsprechenden optischen Dicke hergestellt.

In der Regel wird man bemüht sein, eine vollständige Mischung aus der organischen Verbindung und dem Reagenz herzustellen. Da Reaktionen von organischen Verbindungen meist langsam ablaufen, ist die Zeit, die zur Herstellung einer optimalen Mischung und zur Aufnahme des ersten IR- oder FTIR-Spektrums benötigt wird, im allgemeinen ausreichend kurz. Ist jedoch die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen den Reaktanden hoch, kann es sich empfehlen, das erste IR- oder FTIR-Spektrum mit einer unvollständigen Mischung aufzunehmen, um zu verhindern, daß sich bis zu diesem Zeitpunkt bereits ein wesentlicher Reaktionsumsatz einstellt.

Bei der Aufnahme des ersten IR- oder FTIR-Spektrums müssen die Reaktanden mindestens teilweise noch in nicht umgesetzter Form vorliegen, so daß die Bildung des Komplexes durch das zweite oder durch weitere IR- oder FTIR-Spektren erfaßt werden kann. Idealerweise soll die Reaktion der Reaktanden nach der Mischung noch nicht eingesetzt haben. Dies ist bei sehr schnellen Reaktionen durch die Mischung vor und/oder auf dem Weg zur IR-Küvette nicht möglich, so daß ein Teil der Reaktanden schon miteinander reagiert hat. Beim erfindungsgemäßen Verfahren stört eine teilweise Reaktion der Reaktanden nicht, solange noch genügend Reaktanden miteinander reagieren können und ein Meßsignal erhalten werden kann. Liegt bei der Aufnahme des ersten IR- oder FTIR-Spektrums ein zu geringer Anteil der Reaktanden in nicht umgesetzter Form vor, so können nur Spektren aufgenommen werden, die keine ausreichenden Unterschiede mehr aufweisen. Die Differenzspektren zeigen in einem solchen Fall eine Nulllinie.

Vorzugsweise wird unverzüglich nach der Herstellung der Mischung ein erstes FTIR-Spektrum aufgenommen (Zeitpunkt t_0).

„Unverzüglich“ bedeutet, daß das Spektrum so schnell wie technisch möglich aufgenommen wird. Da die Reaktionsgeschwindigkeit unmittelbar, nachdem die Reaktanden in Kontakt miteinander gebracht werden, am höchsten ist, ist es von wesentlicher Bedeutung für die Schnelligkeit und Genauigkeit des Verfahrens, wenn bei der Aufnahme des ersten Spektrums die Reaktionsgeschwindigkeit noch ausreichend hoch ist und wenn erst anschließend der Hauptteil der Reaktanden reagiert. Vor allem bei langsameren Reaktionen kann bis zur Aufnahme des ersten Spektrums noch einige Zeit gewartet werden, soweit die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktanden anschließend noch ausreichend groß ist, um sie meßtechnisch zu erfassen. Vorteilhafterweise wird jedoch das erste Spektrum innerhalb von einer bis 1000 Millisekunden nach der Mischung der Reaktanden aufgenommen.

Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung können zur Identifizierung des Wirkstoffs Differenzspektren von zwei zu beliebigen Zeit-

punkten aufgenommenen Spektren gebildet werden. Vorzugsweise wird das Differenzspektrum mit dem unmittelbar nach dem Vermischen der Reaktanden aufgenommenen Spektrum (Meßzeitpunkt t_0) gebildet. Als zweites Spektrum wird bevorzugt ein Spektrum, das einen großen zeitlichen Abstand zu diesem Spektrum aufweist, gewählt. Werden mehr als zwei Reaktanden in der Messung verwendet, so wird die Reaktion vorzugsweise durch Zugabe desjenigen Reaktanden gestartet, der zu der zu untersuchenden Komplexbildung führt.

Als Reaktanden werden solche Stoffe eingesetzt, deren pharmazeutische oder Pflanzenschutzwirkung vermutet wird und die näher untersucht werden sollen. Reaktanden können beispielsweise potentielle Arzneimittel, potentielle Herbizide, Fungizide oder Insektizide sein, die in der Lage sind, Komplexe zu bilden.

Vorzugsweise sind unter den Wirkstoffen erfindungsgemäß Stoffe zu verstehen, die eine physiologische Wirkung im pflanzlichen, tierischen oder menschlichen Körper entfalten, wie z. B. Hormone, Vitamine, Enzyme, Pharmaka oder Schädlingsbekämpfungsmittel. Als Wirkstoffe seien Reaktanden wie Proteine, zum Beispiel Enzyme wie ECE oder ACE, Rezeptoren wie Glutamatrezeptoren, Antikörper, Proteininhibitoren wie PAI, Mediatoren, beispielsweise Interferone wie Gamma-Interferon, Interleukine wie Interleukin-2 oder Interleukin-6, Transcriptionsfaktoren wie Sp1, Regulatorproteine, Translokatoren oder Chaperone beispielhaft genannt.

Auch niedermolekulare Substanzen mit einem mittleren Molekulargewicht in einem bevorzugten Molekulargewichtsbereich von 100 bis 10000 Dalton (= d), besonders bevorzugt in einem Bereich von 100 bis 1000 d seien hier genannt. Unter niedermolekularen Substanzen sind organische chemische Verbindungen zu verstehen, die beispielsweise gegebenenfalls substituierte aliphatische oder aromatische Heterocyclen, Aromaten, gesättigte oder ungesättigte Aliphaten, Amine, Ketone, Thioketone, Alkohole, Thiole, Ester, Amide, Ether, Thioether, Nitrile, Isonitrile, Aldehyde oder deren Derivate enthalten.

Auch Wirkstoffe, die über die Freisetzung eines Liganden, der als Reaktand schließlich mit dem oder den weiteren Reaktanden einen Komplex bildet, können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erfaßt werden.

Erfindungsgemäß ist die Identifizierung von Komplexbildungen zwischen Proteinen weniger bevorzugt, da Proteine beispielsweise als Wirkstoffe nicht oral verabreicht werden können und häufig zu allergischen Reaktionen führen. Bevorzugt wird beim erfindungsgemäßen Verfahren die Komplexbildung zwischen Proteinen, DNS oder RNS und niedermolekularen Substanzen untersucht. Mindestens einer der Reaktanden kann beim erfindungsgemäßen Verfahren ein Protein oder eine DNS sein; mindestens ein weiterer Reaktand sollte eine niedermolekulare Substanz sein. Auch Wechselwirkungen zwischen lang- und kurzkettigen DNS oder RNS können erfaßt werden.

Vor allem bei der Komplexbildung von und mit Proteinen, aber auch bei vielen anderen organischen Verbindungen, wird vorzugsweise der mittlere IR-Bereich zwischen 2500 und 12500 nm eingesetzt.

Nach einer Wartezeit wird anschließend ein zweites IR- oder FTIR-Spektrum aufgenommen (Zeitpunkt t_n). Die Wartezeit (= x) bemäßt sich nach der Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktionspartner. Sie beträgt zwischen 1 ms und einem Tag, bevorzugt zwischen 10 ms und 120 min, besonders bevorzugt zwischen 10 ms und 10 min. Ist ein Reaktand ein Protein, ist eine Wartezeit im Bereich von 5 bis 30 s, beispielsweise 20 s, gut geeignet. Wesentlich kürzere Wartezeiten, etwa im Bereich von 10 bis 100 ms, sind beispielsweise für die Untersuchung des Avidin/Biotin-Komplexes erforderlich. Wartezeiten im Minutenbereich sollten bei der Reaktion mancher Antikörper und bei der Hybridisierung von DNS vorgesehen werden.

Im zweiten IR- oder FTIR-Spektrum wird der bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte Reaktionsumsatz dokumentiert. Dieser Reaktionsumsatz läßt sich darstellen, indem aus dem ersten Spektrum, beispielsweise bei t_0 , und dem zweiten Spektrum bei t_n ein Differenzspektrum gebildet wird. Das Differenzspektrum ergibt sich nach $\Delta A_{\nu} = 10 \log(I_{1\nu}/I_{2\nu})$, wobei $I_{1\nu}$ und $I_{2\nu}$ die gemessenen Intensitäten bei der Frequenz ν im ersten bzw. zweiten Spektrum sind.

Besteht das Differenzspektrum im wesentlichen aus einer geraden Linie, hat keine Reaktion stattgefunden, da sich in diesem Fall die Konzentration der Reaktionspartner nicht ändert. Eine Bindung der Reaktanden zeigt sich daher in einem Differenzspektrum, das eine Bandenstruktur aufweist.

Unter Komplexen sind erfindungsgemäß alle kovalenten oder nicht kovalent gebundenen Reaktanden oder deren Teile zu verstehen. Als nicht kovalente Bindungen seien hier beispielhaft Bindungen über van-der-Waals-Kräfte, über Wasserstoffbrückenbildung oder über ionische Bindungen genannt. Erfindungsgemäß werden nicht kovalent gebundene Reaktanden oder deren Teile bevorzugt.

Ein wesentlicher Vorzug ist, daß der Verfahrensablauf automatisiert werden kann, so daß die Bildung der Reaktandenkomplexe schnell entweder nacheinander oder parallel erfolgen kann. Sogenannte Massenscreening-Verfahren sind insbesondere bei der Entwicklung neuer Arzneimittel von Bedeutung. Hierzu wird ein Protein identifiziert, das mit der Manifestation beispielsweise einer Krankheit in Verbindung steht. Die Aufgabe besteht nun darin, ein geeignetes Arzneimittel zu finden, das dieses sogenannte Target-Protein hemmt. Das Target-Protein kann in großen Mengen und hoher Reinheit aus dem entsprechenden biologischen Material gewonnen werden. Eine Vielzahl von Reagenzien, deren pharmazeutische Wirksamkeit vermutet wird, werden getestet, ob sie die gesuchte Hemmwirkung aufweisen. Die Anzahl der zu testenden Reagenzien ist im allgemeinen sehr groß; sie kann 5-, 6- oder sogar 7-stellig sein, so daß der Einsatz einer schnellen,

00:05:06

automatischen Screening-Methode von entscheidender wirtschaftlicher Bedeutung ist.

Diese Aufgabe kann die erfindungsgemäße Vorrichtung übernehmen. Infolge der hohen Scangeschwindigkeiten moderner FTIR-Spektrometer und dem geringen erforderlichen Zeitbedarf sind die Voraussetzungen zum Test einer großen Zahl von Reagenzien geschaffen. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, daß problemlos die üblicherweise eingesetzten Standard-Mikrotiterplatten eingesetzt werden können. Da der Trend zu noch kleineren Mikrotiterplatten mit 384 oder sogar 864 Löchern geht, die ein nochmals geringeres Volumen von ca. 100 µl bzw. ca. 50 µl besitzen, ist die geringe erforderliche Probenmenge bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung von besonderer Bedeutung. Weitere wichtige Vorteile und die Grundlagen für die Eignung des Verfahrens Massenscreeningverfahren sind, daß kein deuteriertes Wasser eingesetzt werden muß und daß die Vorrichtung ohne konstruktive Änderung für eine Vielzahl von Untersuchungen eingesetzt werden kann.

Nachfolgend wird eine Ausführungsform der anhand von Figuren beschrieben.

Es zeigen

Fig. 1 die Ausführungsform der Vorrichtung in einem ersten Betriebszustand;

Fig. 2 die Ausführungsform der Vorrichtung in einem zweiten Betriebszustand;

Fig. 3 die Ausführungsform der Vorrichtung in einem dritten Betriebszustand.

Fig. 1 zeigt die Vorrichtung in einem ersten Betriebszustand, in dem die Ventile 3 und 4 mit einer Testsubstanz bzw. mit einem Targetprotein befüllt werden. Die Testsubstanzen werden in einer Standard-Mikrotiterplatte 11 auf einem xyz-Positioniertisch und das Targetprotein in einem Vorratsbehälter 9 vorgelegt. Die Ventile 3 und 4 sind aus der HPLC-Technik bekannte Drehventile (Fa. Valco); sie sind in der dargestellten Position so geschaltet,

daß sie mit den beiden Niederdruckpumpen 6 und 7 mit einer Testsubstanz aus der Standard-Mikrotiterplatte 11 bzw. mit dem Targetprotein aus dem Vorratsbehälter 9 gefüllt werden können. Ein etwaiger Überschuß wird in beiden Fällen in das Abwassersystem (nicht dargestellt) geleitet.

In dem in Fig. 2 dargestellten Betriebszustand sind die Ventile 3 und 4 umgeschaltet. Die Testsubstanz und das Targetprotein werden mit Hilfe der Hochdruckpumpe 8, die an einen Vorratsbehälter 10 für destilliertes Wasser angeschlossen ist, gemischt und in die IR-Küvette 2 im FTIR-Spektralphotometer 1 transportiert.

In Fig. 3 ist der Betriebszustand dargestellt, in dem das erste (t_0) und nach der Wartezeit das zweite FTIR-Spektrum (t_n) aufgenommen werden. Hierbei ist Ventil 5 umgeschaltet, so daß die Testsubstanz und das Targetprotein in einem abgeschlossenen Leitungssystem isoliert sind.

Nach der Aufnahme der Spektren wird die Meßzelle mit destilliertem Wasser gespült, bevor der Zyklus erneut durchlaufen wird.

Die Vorrichtung ist im wesentlichen aus HPLC-Komponenten aufgebaut. Die Hochdruckpumpe 8 ist eine HPLC-Pumpe (Fa. Alltech), die einem kontinuierlichen Hochdruckbetrieb gewachsen ist. Alle Flüssigkeitsleitungen und Verbindungen bestehen aus HPLC-Komponenten, die bis 400 bar belastbar sind. Um die HPLC-Pumpe zu schonen, wird lediglich destilliertes Wasser gepumpt. Die gewählte Anordnung der HPLC-Drehventile 3, 4 und 5 bringt die zusätzlichen, für das Massenscreening bedeutsamen Vorteile einer effizienten Reinigung des Systems sowie eines verminderten Probenmaterialverbrauchs. Mit Hilfe des Drehventils 5 wird der Fluß des destillierten Wassers aus dem Vorratsbehälter 10 durch die Hochdruckpumpe 8 umgeleitet anstatt angehalten, um den Fluß durch die IR-Küvette anzuhalten. Dadurch wird die Pumpe geschont und es ergibt sich eine schnellere Antwortzeit. Außerdem werden hierdurch die Eingangs- und Ausgangsleitungen der IR-Küvette

28.05.98

kurzgeschlossen, weshalb sich der Überdruck rasch ausgleicht und Schichtdickenänderungen infolge einer Aufwölbung der IR-Küvette beseitigt werden.

Mit der in den Figuren dargestellten Vorrichtung können Durchflußgeschwindigkeiten bis 40 ml/min realisiert werden, was einem Austausch des Inhalts der IR-Küvette innerhalb von 15 ms entspricht. Dabei wird ein Druck von bis zu ca. 150 bar verzeichnet. Das Umleiten des Flüssigkeitstroms mit Hilfe des Ventils 5 erfolgt in 20 ms. Je 100 µl Targetprotein und Testsubstanz sind für die Aufnahme der FTIR-Spektren ausreichend, wobei durch eine Optimierung der Probenbedarf noch um einen Faktor 3 bis 5 vermindert werden kann.

28.05.98

Forschungszentrum
Karlsruhe GmbH

Karlsruhe, den 27. Mai 1998
PLA 9842 RÜ/he

BASF AG

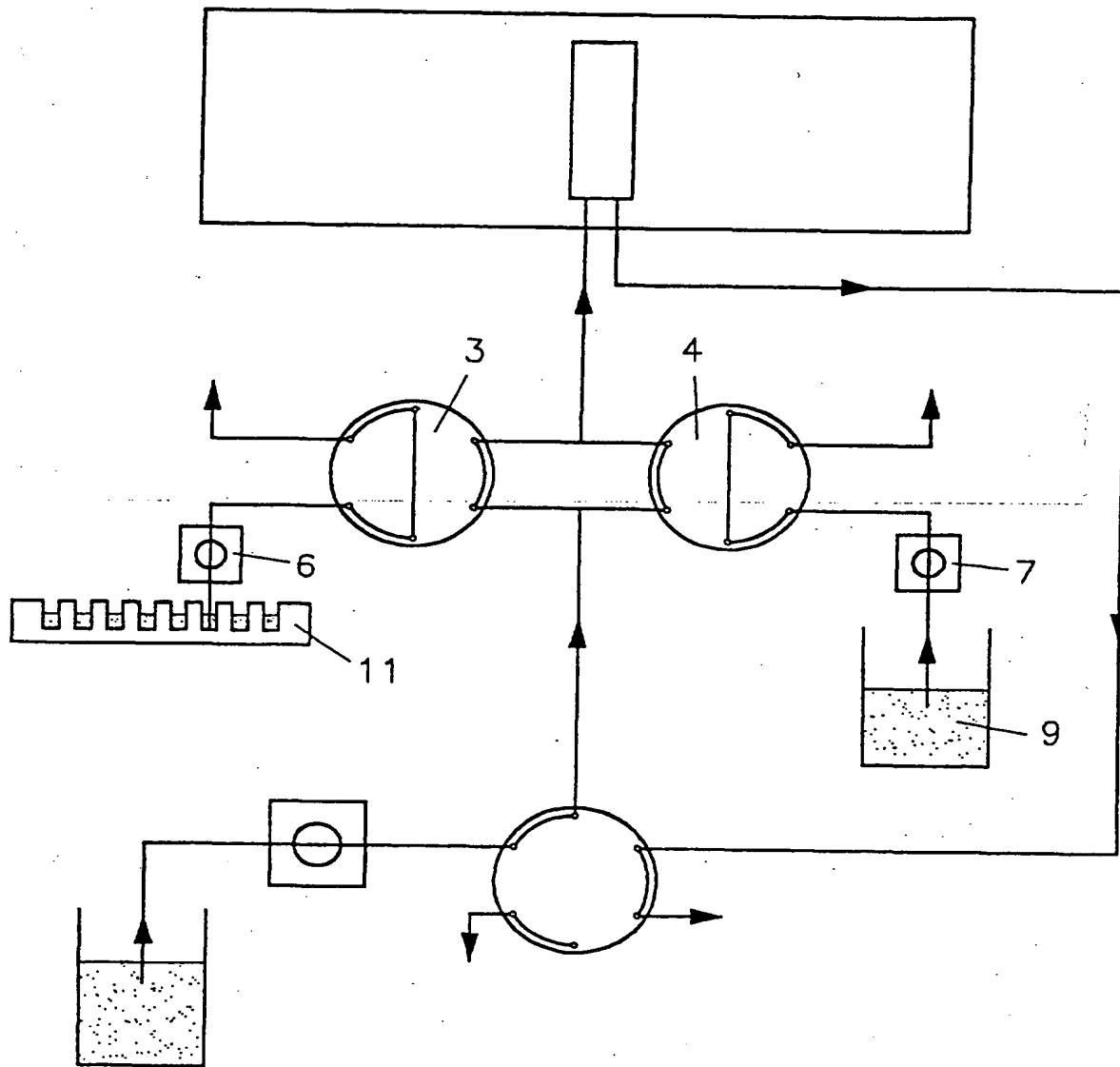
Ludwigshafen, den 27. Mai 1998

Schutzanspruch:

1. Vorrichtung zur Identifizierung von Wirkstoffen, mit der mindestens zwei einen Komplex bildende Reaktanden miteinander vermischt werden und das IR-Spektrum der einzelnen im Gemisch noch nicht umgesetzten Reaktanden zu einem ersten Zeitpunkt aufgenommen werden kann, und bei der mindestens ein weiteres IR-Spektrum zu einem zweiten Zeitpunkt den Komplex der Reaktanden erfassen kann, so daß sich ein Differenzspektrum von zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten aufgenommenen IR-Spektren bilden läßt und diejenigen Reaktanden als Wirkstoffe auswählbar sind, deren Differenzspektrum eine Bandenstruktur aufweist, bei der
 - mit einer ersten Pumpe (6) ein erstes Probenschleifenventil (3) mit einem ersten Reaktanden und
 - mit einer zweiten Pumpe (7) ein zweites Probenschleifenventil (4) mit mindestens einem zweiten Reaktanden befüllbar ist,
 - die Probenschleifenventile (3, 4) in der Weise miteinander verschaltbar sind, daß sich die organische Verbindung und das Reagenz in einen abgeschlossenen Raum einschließen lassen, und
 - die organische Verbindung und das Reagenz mit einer dritten Pumpe (8) mischen und aus dem abgeschlossenen Raum in eine IR-Küvette (2) fördern lassen.

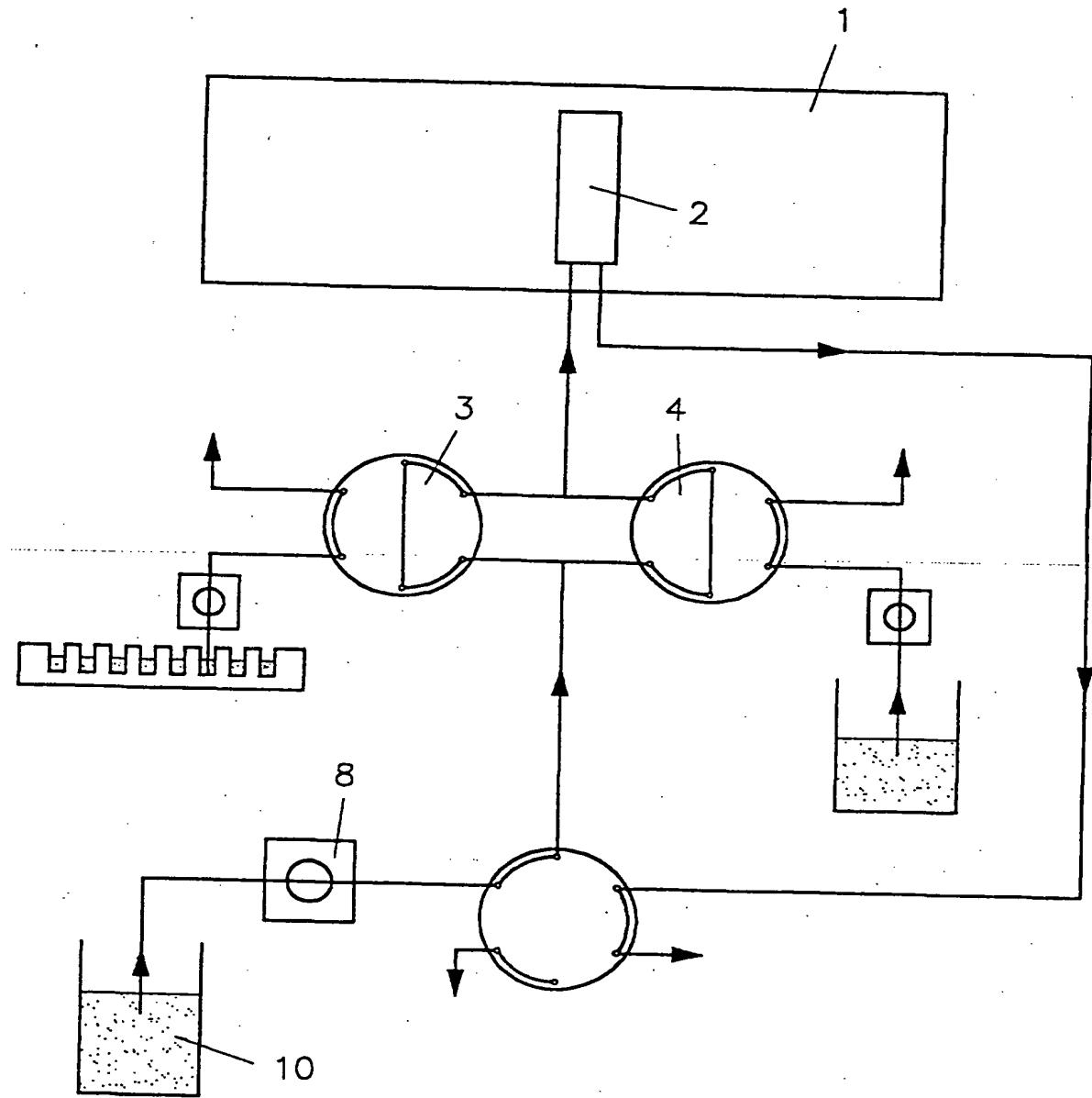
22.05.98
PLA 9842

Fig. 1



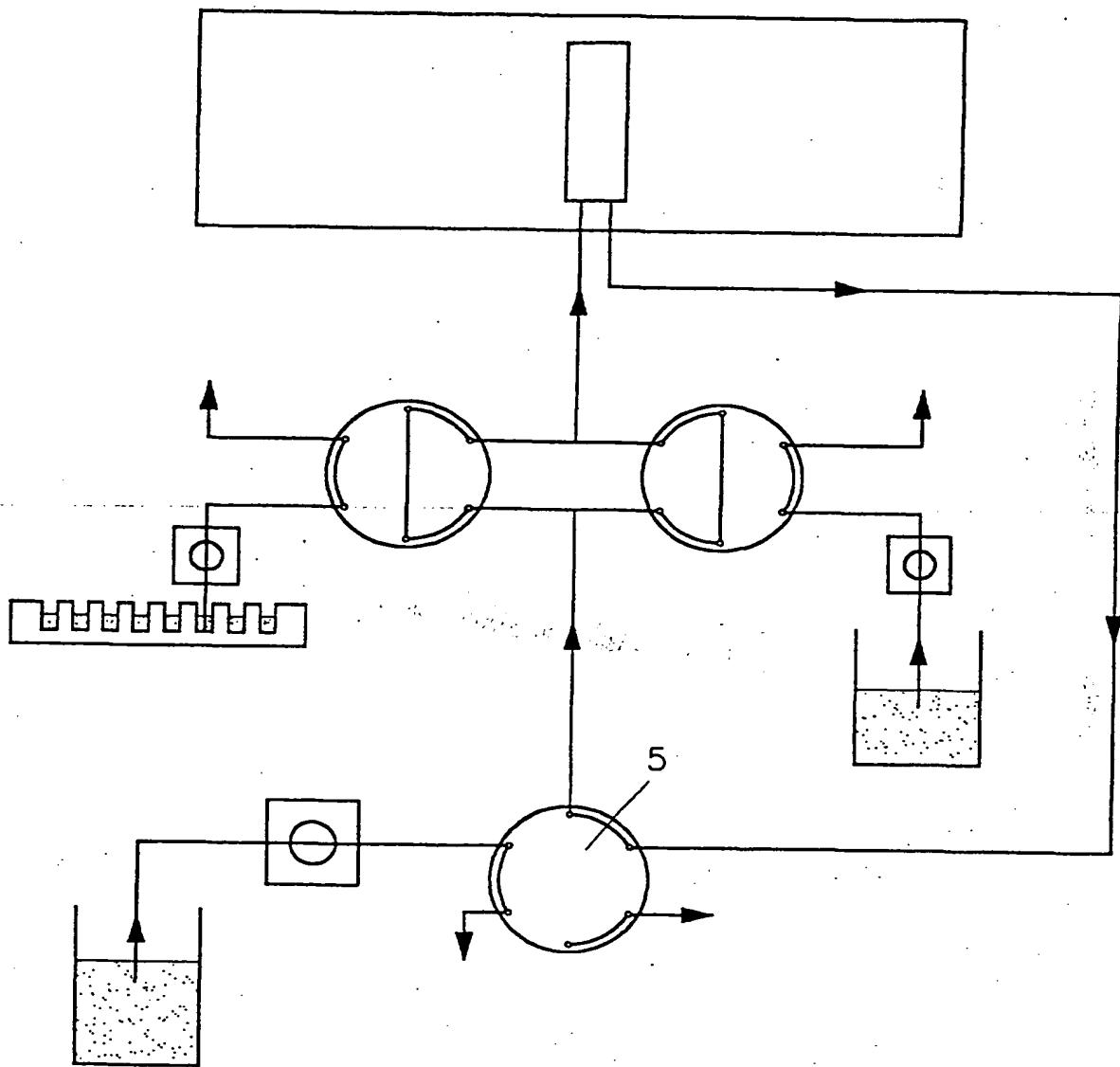
20.06.9842

Fig. 2



20.06.9842

Fig. 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)